

Игорь КВЕТНОЙ,
д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки, руководитель
отдела патоморфологии ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии
им. Д. О. Отта» СЗО РАМН (Россия)

Ирина СМЕРНОВА,
д. м. н., профессор кафедры инфекционных болезней,
эпидемиологии и дерматовенерологии Санкт-Петербургского
государственного университета (Россия)

MESO-WHARTON: ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ СИГНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПЕПТИДА P199

Перспективным направлением в создании препаратов для коррекции и профилактики возрастной инволюции кожи является разработка пептидов с различным механизмом действия, в том числе и таких, основной мишенью для которых являются стволовые клетки. К этой группе относится инъекционный препарат медицинского назначения Meso-Wharton P199, предназначенный для интенсивной репарации кожи

Процесс старения, конечно же, затрагивает все отделы и клетки кожи, в том числе стволовые. Возрастные изменения стволовых клеток могут включать снижение их мобилизации (нарушение сигнальных механизмов), а также снижение числа стволовых клеток, способных адекватно отвечать на стимулы. Перспективным направлением в создании препаратов для коррекции и профилактики возрастной инволюции кожи является разработка пептидов с различным механизмом действия, в том числе и таких, основной мишенью для которых являются стволовые клетки. В данной статье речь пойдет об одном из таких препаратов, предназначенных для интенсивной репарации кожи, о Meso-Wharton P199 [6]. Состав препарата повторяет состав Вартонова студня пуповины, по аналогии с которым он и был создан. Разработчики предполагают, что таким образом обеспечивается не только работа пептида P199, но и воссоздаются эффекты микроокружения стволовых клеток.

НАУЧНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью настоящего исследования являлась сравнительная комплексная оценка влияния пептида P199 и препарата Meso-Wharton P199 на экспрессию сигнальных молекул, являющихся маркерами процессов обновления эпидермиса и дермы, в культурах клеток с разным уровнем возрастной инволюции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на первичных культурах клеток – культуре кератиноцитов человека, содержащей преимущественно базальные клетки, и смешанной культуре фибробластов человека. Клетки взрослого человека выделяли из переднебоковой поверхности кожи лица, полученной в результате пластической операции.

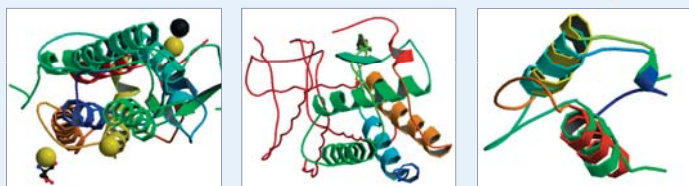
Для каждой культуры были сформированы три группы:

- 1-я группа (контроль) – культура клеток, в которую вводился физиологический раствор;

ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР В УКРАИНЕ И СТРАНАХ СНГ



Тел.: (099) 730-6433, (067) 566-0348
Информационная поддержка: 0 800 500 725
www.emet.in.ua



PEPTIDE P-199

Препарат Meso-Wharton P199 стимулирует процессы обновления клеточных структур эпидермиса и дермы при внутривенном введении инъекционным путем

- 2-я группа (опыт) – культура клеток, в которую вводился пептид P199 в концентрации 15 нг/мл;
- 3-я группа (опыт) – культура клеток, в которую вводился препарат Meso-Wharton P199 в количестве, обеспечивающем концентрацию изучаемого пептида 15 нг/мл.

Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела к ряду маркеров, характеризующих процессы обновления эпидермиса и дермы (табл. 1), и вторичные антитела – биотинилированные антимышиные иммуноглобулины (Novolink Polymerdetection system, Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse, 1:40).

Статистическую обработку данных выполняли в программе Statistica 8.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным проведенных исследований, пептид P199 и препарат Meso-Wharton P199 оказывали стимулирующее действие на пролиферативную активность клеток кожи – фибробластов и кератиноцитов. Этот эффект был более выражен в «зрелой» и «старой»

культурах фибробластов и «молодой» культуре кератиноцитов.

Так, при культивировании фибробластов в присутствии Meso-Wharton P199 пролиферативная активность клеток в «молодой» культуре увеличилась в 1,2 раза ($p = 0,007$), в культуре «зрелых» фибробластов – в 3,4 раза ($p = 0,000000$) и в культуре «старых» клеток – в 2,2 раза ($p = 0,006$) по сравнению с контролем. Достоверные изменения показателя площади экспрессии маркера Ki67 при культивировании фибробластов в присутствии пептида P199 были отмечены только в культуре «зрелых» и «старых» клеток – в 2,2 и 1,5 раза ($p = 0,000000$ и $p = 0,001$) соответственно (табл. 2).

Добавление дозы препарата Meso-Wharton P199 к кератиноцитам сопровождалось увеличением относительной площади экспрессии Ki67 в 3,4 раза в «молодой» культуре и в 2,8 раза в «зрелой» культуре ($p = 0,000000$). Эффекты пептида P199 были несколько менее выраженными: показатели площади экспрессии выросли в 2,1 и 1,6 раза ($p = 0,000008$, $p = 0,0002$) соответственно (табл. 3).

Экспрессия эндоглина (CD105), маркера стволовых клеток дермы, изменялась недостоверно как в присутствии

препарата Meso-Wharton P199, так и пептида P199. А вот показатели экспрессии $\rho 63$ и $\beta 1$ -интегрин кератиноцитами существенно изменялись. Площадь экспрессии $\rho 63$ в культуре «молодых» клеток при введении пептида P199 и препарата Meso-Wharton P199 увеличивалась по сравнению с контролем в 2,1 и 3,1 раза соответственно ($p = 0,000000$), а в культуре «зрелых» клеток – в 2,4 ($p = 0,000005$) и 1,3 раза ($p = 0,009$) соответственно (табл. 4).

По результатам проведенных исследований было установлено, что препарат Meso-Wharton P199 и пептид P199 оказывали выраженное действие на синтетическую активность культивируемых фибробластов (табл. 5). Этот эффект был особенно значимым в культуре немолодых клеток. Причем стимулирующее воздействие препарата Meso-Wharton P199 было более выраженным в культурах «зрелых» клеток, а Peptide P199 – в культуре «старых» клеток.

Так, в «молодой» культуре площадь экспрессии проколлагена I типа повышалась в присутствии Meso-Wharton P199 в 3,9 раза, а пептида P199 – в 2,8 раза по сравнению с контролем ($p = 0,000000$ и $p = 0,000005$

Табл. 1. Маркеры, характеризующие процессы обновления эпидермиса и дермы

Маркер	Антитела	Биологический смысл
Проколлаген I типа	1:50, Lifespan Biosciences	Проколлаген I типа может быть использован как маркер биосинтеза коллагена I типа
CD105	1:50, Novocastra	Эндоглин, или CD105, – трансмембранный белок, который является рецептором трансформирующего фактора роста β , контролирующего пролиферацию, клеточную дифференцировку и другие функции в большинстве клеток. Один из маркеров стволовых клеток дермы
p63	1:50, Santa Cruz	Белок p63 участвует в реализации многих функций, которые необходимы для самоподдержания стволовых клеток эпидермиса. Его экспрессия обеспечивает адгезию кератиноцитов и подавление апоптоза, а также поддержание целостности эпидермиса как ткани. Экспрессия p63 является характерной чертой стволовых клеток эпидермиса
β 1-интегрин	Novocastra	В коже β 1-интегрин экспрессируется в базальном слое эпидермиса. При выключении его экспрессии клетки уходят в терминальную дифференцировку, что отражает возможность использования его как маркера стволовых клеток эпидермиса
Ki 67	1:75, Dako	Белок Ki 67 экспрессируется во время всех активных фаз цикла клетки (G1, S, G2 и митоз), но отсутствует в фазе G0. Это показатель обновления (клеточной пролиферации) клеток дермы и эпидермиса

Табл. 2. Относительная площадь экспрессии маркера Ki67 в культуре фибробластов

Группы	Пассаж 3 («молодые» клетки)	Пассаж 7 («зрелые» клетки)	Пассаж 13 («старые» клетки)
Контроль	53,72 \pm 4,22	23,97 \pm 6,87	24,78 \pm 4,87
Meso-Wharton P199	62,37 \pm 1,68	77,96 \pm 1,07	55,15 \pm 2,03
Пептид P199	47,58 \pm 5,70	53,32 \pm 3,31	37,52 \pm 1,44

Табл. 3. Относительная площадь экспрессии Ki67 в культуре кератиноцитов

Группы	Пассаж 1 («молодые» клетки)	Пассаж 7 («зрелые» клетки)
Контроль	16,57 \pm 2,89	27,83 \pm 1,66
Meso-Wharton P199	55,59 \pm 5,66	77,08 \pm 7,18
Пептид P199	55,59 \pm 5,66	45,01 \pm 5,09

Табл. 4. Относительная площадь экспрессии маркеров стволовости кератиноцитами

Группы	Пассаж 1 («молодые» клетки)		Пассаж 3 («зрелые» клетки)	
	p63	β 1-интегрин	p63	β 1-интегрин
Контроль	25,79 \pm 2,20	30,96 \pm 1,93	35,23 \pm 3,73	17,77 \pm 1,23
Meso-Wharton P199	80,39 \pm 5,96	61,06 \pm 3,46	45,47 \pm 5,28	36,2 \pm 4,37
Пептид P199	53,35 \pm 3,61	67,24 \pm 1,22	61,25 \pm 6,43	36,85 \pm 4,32

Табл. 5. Относительная площадь экспрессии проколлагена I типа в культуре фибробластов

Группы	Пассаж 3 («молодые» клетки)	Пассаж 7 («зрелые» клетки)	Пассаж 13 («старые» клетки)
Контроль	4,34 \pm 0,46	23,85 \pm 3,09	1,58 \pm 0,45
Meso-Wharton P199	16,74 \pm 2,34	76,05 \pm 2,6	25,87 \pm 3,71
Пептид P199	12,31 \pm 1,46	46,44 \pm 3,66	35,80 \pm 6,16

соответственно), в «зрелой» культуре – в 3,2 и 1,9 раза, а в культуре «старых» клеток в 16,4 и 22,65 раза ($p = 0,000000$, $p = 0,000001$) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенного исследования был выявлен стимулирующий эффект, оказываемый пептидом P199 и инъекционным препаратом Meso-Wharton P199 на пролиферативную активность кератиноцитов и фибробластов в культуре, а также подтверждена синтетическая активность фибробластов. Эти данные можно трактовать в пользу предположения о том, что пептид P199 и препарат Meso-Wharton P199 стимулируют процессы обновления клеточных структур эпидермиса и дермы при нанесении на кожу и при внутрикожном введении инъекционным путем.

Стимулирующий эффект в отношении фибробластов был более выраженным в культуре «зрелых» и «старых» клеток, что соотносится с клиническими данными о более высокой эффективности препарата у пациентов старших возрастных групп. ■

ЛИТЕРАТУРА:

1. Giangreco A., Qin M., Pintar J. E., Watt F. M. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging // *Aging Cell.* – 2008; 7 (2): 250–259.
2. Moore K. A., Lemischka I. R. Stem cells and their niches // *Science.* – 2006. 311: 1 880–1 885.
3. Sharpless N. E., DePinho R. A. How stem cells age and why this makes us grow old // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007; 8: 703–713.
4. Weber C., Pohl S., Poertner R., Pino-Grace P., Wallrapp C., Geigle P., Czermak P. Bioreactor system for expansion and differentiation of human mesenchymal stem cells: design and scale-up strategy // *GIT Bioprocessing.* – 2009; 1: 9–13.
5. Zouboulis C. C., Adjaye J., Akamatsu H., Moe-Behrens G., Niemann C. Human skin stem cells and the ageing process // *Exp Gerontol.* – 2008; 43 (11): 986–997.
6. Петриковский Б. Клеточное обновление возрастной кожи как результат пептидной регуляции собственных стволовых клеток // *Эстетическая медицина.* – 2012; XI (2): 283–293.